



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3626375 A 1**

⑤1 Int. Cl. 4:
C07 D 501/56
A 61 K 31/545

②1 Aktenzeichen: P 36 26 375.3
②2 Anmeldetag: 4. 8. 86
④3 Offenlegungstag: 12. 2. 87

Behördeneigentum

DE 3626375 A 1

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1
05.08.85 US 762,235

⑦1 Anmelder:
Bristol-Myers Co., New York, N.Y., US

⑦4 Vertreter:
Kinzebach, W., Dipl.-Chem. Dr.phil.; Riedl, P.,
Dipl.-Chem.Dr.rer.nat.; Köster, H., Dipl.-Chem.
Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8000 München

⑦2 Erfinder:
Kaplan, Murray A., Syracuse, N.Y., US; Hudyma,
Thomas W.; Lipper, Robert A., Manlius, N.Y., US

⑤4 Cephalosporinsalze und diese enthaltende injizierbare Mittel

Die Erfindung betrifft kristalline Schwefelsäure, Di-Salpe-
tersäure-, Mono-Chlorwasserstoffsäure-, Di-Chlorwasser-
stoffsäure- und Di- und Sesqui-Orthophosphorsäure-Addi-
tionssalze von 7-[α -(2-Aminothiazol-4-yl)- α -(Z)-methoxy-
minoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-
cephem-4-carboxylat (Zwitterion), die selbst bei erhöhten
Temperaturen stabil sind. Das kristalline Schwefelsäuread-
ditionssalz stellt man her, indem man

- (a) mindestens 1 Moläquivalent Schwefelsäure mit
(b) dem Zwitterion

in einer solchen Menge vermischt, daß es in der Mischung in
einer Konzentration von mehr als 25 mg/ml vorliegt, die Kri-
stallisation herbeiführt und die Kristalle abtrennt, wäscht
und trocknet. Die kristallinen Monohydrochlorid-, Dihydro-
chlorid- und Orthophosphat-Salze stellt man her, indem man
das Zwitterion in der geeigneten Menge der Säure löst, die
Kristallisation durch Zugabe von Aceton herbeiführt und die
Kristalle isoliert. Es werden auch physikalische Gemische
dieser Salze mit bestimmten Basen bereitgestellt, die in sol-
chen Anteilen vorliegen, daß nach Verdünnen mit Wasser
bis zu einer injizierbaren Konzentration ein pH-Wert von
etwa 3,5 bis etwa 7 erzielt wird.

DE 3626375 A 1

Patentansprüche

1. Temperaturstabile kristalline Salze von 7-[α -(2-Aminothiazol-4-yl)- α -(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Schwefelsäure-, Di-Salpetersäure-, Mono-Chlorwasserstoffsäure- und Di-Chlorwasserstoffsäure-Additionssalzen und Orthophosphorsäure-Additionssalzen mit 1,5—2 Moläquivalenten H_3PO_4 , oder die Solvate davon.

2. Kristalline Salze nach Anspruch 1, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Schwefelsäure-, Mono-Chlorwasserstoffsäure-, Di-Chlorwasserstoffsäure- und Orthophosphorsäure-Additionssalzen oder die Solvate davon.

3. Kristallines Schwefelsäureadditionssalz nach Anspruch 1.

4. Kristallines 7-[α -(2-Aminothiazol-4-yl)- α -(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat-sulfatsalz mit folgendem Röntgenbeugungs-Pulverdiagramm:

d (Abstand in Å)	I/I ₀ (%)
9,20	100
6,86	50
5,50	28
5,09	22
4,50	38
4,41	44
4,19	63
3,78	38
3,64	44
3,39	25
3,31	31
3,15	47

5. Kristallines Orthophosphorsäure-Additionssalz nach Anspruch 1 und die Hydrate davon.

6. Kristallines 7-[α -(2-Aminothiazol-4-yl)- α -(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methylpyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat-phosphat mit folgendem Röntgenbeugungs-Pulverdiagramm:

d	I/I ₀
11,04	- 32
9,2	- 16
7,89	- 24
7,02	- 42
6,7	- 32
5,5	- 26
4,64	- 100
4,456	- 53
4,3	- 58
3,88	- 26
3,75	- 89
3,56	- 21
3,31	- 26
3,05	- 16

7. Physikalisches Gemisch aus mindestens einem der Salze nach einem der Ansprüche 1 bis 6 mit einer pharmazeutisch verträglichen nicht-toxischen organischen oder anorganischen Base in solchen Anteilen, daß nach Verdünnen des Gemisches mit Wasser bis zu einer injizierbaren Konzentration ein pH-Wert von etwa 3,5 bis etwa 7 erzielt wird.

8. Physikalisches Gemisch nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz und die Base in solchen Anteilen vorhanden sind, daß nach Verdünnen des Gemisches mit Wasser bis zu einer injizierbaren Konzentration ein pH-Wert von etwa 4 bis 6 erzielt wird.

9. Physikalisches Gemisch nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Base um L(+)-Lysin handelt.

10. Physikalisches Gemisch nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Base um L(+)-Arginin handelt.

11. Verfahren zur Herstellung temperaturstabiler kristalliner Salze von 7-[α -(2-Aminothiazol-4-yl)- α -(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat (Zwitterion), ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Schwefelsäure-, Di-Salpetersäure-, Mono-Chlorwasserstoffsäure- und Di-Chlorwasserstoffsäure-Additionssalzen und Orthophosphorsäure-Additionssalzen mit 1,5—2 Moläquivalenten H_3PO_4 , oder der Salze davon dadurch gekennzeichnet, daß man (a) eine wäßrige Mi-

schung hergestellt, die (i) mindestens 1 Moläquivalent Schwefel- oder Chlorwasserstoffsäure oder (ii) mindestens 2 Moläquivalente Salpeter- oder Chlorwasserstoffsäure oder (iii) 1,5–2 Moläquivalente Phosphorsäure und (iv) das Zwitterion enthält,
 (b) das Säureadditionssalz kristallisiert, wobei man die Kristallisation gegebenenfalls in Gegenwart eines organischen Lösungsmittels durchgeföhrt, und
 (c) das kristalline Säureadditionssalz isoliert.

12. Verfahren nach Anspruch 11 zur Herstellung des Schwefelsäure-Additionssalzes, dadurch gekennzeichnet, daß man

(a) eine wäßrige Mischung herstellt aus (i) mindestens 1 Moläquivalent Schwefelsäure und (ii) dem Zwitterion,

(b) das Schwefelsäure-Additionssalz kristallisiert, wobei, falls das Zwitterion in der Mischung in einer Konzentration von weniger als 25 mg/ml vorliegt, man die Kristallisation in Gegenwart eines organischen Lösungsmittels durchföhrt, und

(c) das kristalline Schwefelsäureadditionssalz isoliert.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man Stufe (b) in einem wäßrigen Medium durchföhrt, das kein organisches Lösungsmittel enthält.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man das Zwitterion in Stufe (a) in einer solchen Menge einsetzt, daß es in der Mischung in einer Konzentration von weniger als 500 mg/ml vorliegt.

15. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man das Zwitterion in Stufe (a) in einer solchen Menge einsetzt, daß es in der Mischung in einer Konzentration größer als 25 mg/ml vorliegt.

16. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man das Zwitterion in Stufe (a) in einer solchen Menge einsetzt, daß es in der Mischung in einer Konzentration von 100 mg/ml bis etwa 200 mg/ml vorliegt.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Cephalosporinsalze und diese enthaltende, injizierbare Mittel. Die Erfindung betrifft insbesondere temperaturstabile semi-synthetische Cephalosporinsalze, die Herstellung dieser Salze und diese Salze enthaltende Gemische.

In der US-PS 44 06 899 (Aburaki et al.) ist die Zwitterionenform von 7-[α -(2-Aminothiazol-4-yl)- α -(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat beschrieben. Dort sind auch entsprechende Säureadditionssalze erwähnt, die in injizierbaren Mitteln in der Zwitterionenform vorliegen. Es wird ausgeföhrt, daß die Zwitterionenform ein breiteres Wirkungsspektrum besitzt als Cefotaxim und Cefotaxim.

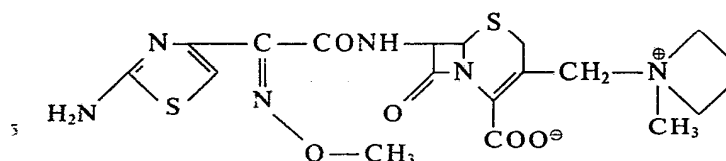
Jedoch sind die dort beschriebenen Cephalosporine in Form der injizierbaren Mittel nur einige Stunden stabil. Das Zwitterion ist selbst als Trockenpulver bei Raumtemperatur instabil und verliert 30% oder mehr seiner Aktivität bei 1-wöchiger Lagerung bei erhöhter Temperatur (z. B. 45°C und darüber). Daher ist es erforderlich, eine speziell isolierte Verpackung einzusetzen und/oder zu kühlen. Dieses Präparat besitzt somit, verglichen mit Cefotaxim und Cefotaxim Nachteile bezüglich der Lagerung und der Verpackung.

Obwohl im oben genannten US-Patent Säureadditionssalze erwähnt sind, ist in dieserr Patentschrift jedoch nicht ausgeföhrt, wie diese Salze hergestellt werden, und welche von ihnen — falls überhaupt — in Trockenpulverform über eine gute Stabilität verfügen. Kessler et al., "Comparison of a New Cephalosporin, BMY 28 142, with Other Broad-Spectrum β -Lactam Antibiotics", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Band 27, Nr. 2, Seiten 207–216, Februar 1985, erwähnen das Sulfatsalz, geben jedoch nicht an, wie dieses Salz erhalten werden kann oder daß dieses Salz bei Raumtemperatur stabil ist und als Trockenpulver über eine gute Stabilität selbst bei erhöhter Temperatur verfügt.

Es wurde nun gefunden, daß bestimmte kristalline Säureadditionssalze von 7-[α -(2-Aminothiazol-4-yl)- α -(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat als Trockenpulver über eine ausgezeichnete Stabilität bei Raumtemperatur verfügen und verglichen mit der Zwitterionenform bei erhöhter Temperatur stabiler sind. Als "Trockenpulver" wird ein solches bezeichnet, dessen Feuchtigkeitsgehalt geringer als 5 Gew.-% ist.

Diese Säureadditionssalze sind kristalline Salze von 7-[α -(2-Aminothiazol-4-yl)- α -(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Schwefelsäure-, Di-Salpetersäure-, Mono-Chlorwasserstoffsäure- und Di-Chlorwasserstoffsäure-Additionssalzen und Orthophosphor-Additionssalzen (1,5–2 Mol Orthophosphorsäure pro Mol Salz; dies entspricht beispielsweise einem Bereich von den Sesqui- bis zu den Di-Orthophosphorsäuresalzen). Erfindungsgemäß sind auch die Solvate dieser Salze umfaßt. Der Ausdruck "kristallin" bringt zum Ausdruck, daß die Moleküle zumindest teilweise in charakteristischer Weise angeordnet sind. Während die erfindungsgemäß hergestellten Schwefelsäure-, Di-Salpetersäure-, Di-Chlorwasserstoffsäure- und Orthophosphorsäure-Additionssalze deutlich kristalline Form besitzen (nachgewiesen durch Doppelbrechung unter einem polarisierenden Mikroskop), wobei die Moleküle genau ausgerichtet sind, besitzen die erfindungsgemäß hergestellten Mono-Chlorwasserstoffsäure-Additionssalze nur eine gewisse Gleichmäßigkeit in der Anordnung ihrer Moleküle (dies zeigt sich an einer nur geringen Doppelbrechung unter dem polarisierenden Mikroskop) und somit keine präzise festgelegte Anordnung, so daß sie als "schwach"-kristallin bezeichnet werden müssen. Der hier benutzte Ausdruck "kristallin" umfaßt somit nicht nur die deutlich kristallinen Salze, sondern auch das "schwach"-kristallin auftretende Mono-Chlorwasserstoffsäure-Additionssalz.

Die hier beschriebenen Säureadditionssalze setzen, wenn sie zu wäßrigen, injizierbaren Mitteln verarbeitet werden, das Zwitterion in der Lösung frei. Dieses Zwitterion besitzt die folgende Struktur:



Die Breitbandwirkung dieses Zwitterions und somit der aus den hier beschriebenen Salzen hergestellten wäßrigen Mitteln gegenüber verschiedenen Organismen geht aus den Daten der US-PS 44 06 899 (Abruraki et al.) hervor.

Die aus den hier beschriebenen Säureadditionssalzen erhaltenen wäßrigen Mittel, die dadurch hergestellt werden, daß man lediglich steriles Wasser zugibt, stellen saure Lösungen dar, die nach intravenöser Verabreichung an Kaninchen eine nicht zu akzeptierende Reizung hervorrufen. Nach intramuskulärer Verabreichung dieser Lösungen an Kaninchen stellt man eine nicht zu akzeptierende Schmerzreaktion fest. Die Löslichkeiten der Schwefelsäure- und Disalpetersäureadditionssalze sind geringer und für typische injizierbare Mittel unzureichend. Es wurde nun gefunden, daß diese unerwünschten Nachteile dadurch überwunden werden können, daß man die hier beschriebenen Salze in Form eines physikalischen Gemisches (es handelt sich um eine Mischung von Feststoffen) mit einer pharmazeutisch verträglichen nicht-toxischen organischen oder anorganischen Base in solchen Anteilen einsetzt, daß nach Verdünnen mit Wasser ein pH-Wert von etwa 3,5 bis etwa 7 und eine Zwitterionenaktivität von 1 mg/ml bis 400 mg/ml, üblicherweise 250 mg/ml (bestimmt mittels high performance liquid chromatography, HPLC) erzielt wird.

Ein erfindungsgemäß bevorzugtes Salz ist das kristalline Schwefelsäureadditionssalz. Es ist aufgrund seiner geringen Löslichkeit in Wasser (25 mg/ml) bevorzugt, so daß dieses Salz beim Kristallisieren aus einem wäßrigen Medium in hoher Ausbeute erhalten werden kann.

Das kristalline Schwefelsäureadditionssalz stellt man nach einem Verfahren her, wobei man (a) eine wäßrige Mischung herstellt aus (i) mindestens 1 Moläquivalent Schwefelsäure und (ii) aus einer solchen Menge des Zwitterions, daß es in der Mischung in einer Konzentration größer als 25 ml/mg vorliegt, (b) das Schwefelsäureadditionssalz kristallisiert und (c) das kristalline Schwefelsäureadditionssalz isoliert.

Die hier beschriebenen kristallinen Salze (im folgenden als erfindungsgemäße Salze bezeichnet) sind bei Raumtemperatur ausgezeichnet stabil. Ihr Wirksamkeitsverlust (bestimmt mittels HPLC) nach 1-monatiger Lagerung bei Raumtemperatur beträgt weniger als 1%. Diese Salze sind auch bei erhöhten Temperaturen ausgezeichnet stabil; ihr Wirksamkeitsverlust (bestimmt mittels HPLC) nach 1-monatiger Lagerung bei 45–56°C beträgt weniger als 15%.

Das Schwefelsäureadditionssalz ist bevorzugt. Der Wirksamkeitsverlust dieses Salzes beträgt nach 1-monatiger Lagerung bei 45–56°C weniger als 10%. Sehr bedeutsam ist, daß dieses Salz über eine geringe Löslichkeit in Wasser verfügt, i. e. etwa 25 mg/ml. Die Verluste beim Kristallisieren dieses Salzes aus Wasser sind daher sehr gering.

Auch das hier beschriebene Di-Salpetersäureadditionssalz verfügt über eine niedrige Löslichkeit in Wasser, i. e. etwa 60 mg/ml. Somit sind auch bei diesem Salz die Verluste beim Kristallisieren aus Wasser gering.

Die Löslichkeiten der Monochlorwasserstoff-, Dichlorwasserstoff und Sesqui- oder Diorthophosphorsäure-Additionssalze sind größer als 200 mg/ml. Diese Salze kristallisiert man daher nicht aus Wasser, sondern vorzugsweise aus organischen Lösungsmitteln, um gute Ausbeute zu erzielen.

Wie bereits oben ausgeführt, stellt man das Schwefelsäureadditionssalz nach einem Verfahren her, bei dem man

(a) eine wäßrige Mischung herstellt aus (i) mindestens 1 Moläquivalent Schwefelsäure und (ii) dem Zwitterion herstellt, das man in einer solchen Menge einsetzt, daß es in der Mischung in einer Konzentration größer als 25 mg/ml vorliegt, und

(b) kristallisiert und

(c) das kristalline Schwefelsäureadditionssalz isoliert.

Vorzugsweise setzt man das Zwitterion in der Stufe (a) in einer solchen Menge ein, daß es in der Mischung in einer Konzentration von 100 mg/ml bis etwa 200 mg/ml vorliegt. Die Stufe (b) führt man vorzugsweise in einem wäßrigen Medium durch, das kein organisches Lösungsmittel enthält. Üblicherweise setzt man nicht mehr als 2 Moläquivalente Schwefelsäure in Stufe (a) ein. Das Zwitterion setzt man normalerweise in Stufe (a) in einer solchen Menge ein, daß es in der Mischung in einer Konzentration von weniger als 500 mg/ml vorliegt.

Die Stufe (a) führt man durch, indem man entweder das feste Zwitterion zu einer Schwefelsäurelösung (z. B. 1N H₂SO₄) unter heftigem Rühren unter Bildung einer Lösung zugibt. In alternativer Weise kann man die Stufe (a) durchführen, indem man das feste Zwitterion in Wasser löst und langsam unter Rühren Schwefelsäure zugibt, wobei man eine Lösung erhält.

Die Stufe (b) führt man durch, indem man die Kristallisation induziert, beispielsweise durch Animpfen. Dann schlämmt man auf, vorzugsweise 15 min bis 2 h. Diese Kristallisationsstufe führt man vorzugsweise in einem wäßrigen Medium durch, das kein organisches Lösungsmittel aufweist. In diesem Fall ist die erzielte Reinheit normalerweise höher als 98%. Obgleich die Anwesenheit eines organischen Lösungsmittels, beispielsweise Aceton, die Kristallisation fördert und die Ausbeute erhöht, indem die Löslichkeit des gebildeten Schwefelsäureadditionssalzes im Kristallisationsmedium herabgesetzt wird, kann dadurch auch die Präzipitation von Verunreinigungen begünstigt werden, was sich in einer verminderten Reinheit niederschlägt. Setzt man das Zwitterion in der Stufe (a) in einer so großen Menge ein, daß es in der Mischung in einer Menge von weniger als 25 mg/ml vorliegt, dann muß man ein organisches Lösungsmittel, vorzugsweise Aceton, dem Kristallisationsmedium

einverleiben, um annehmbare Ausbeuten zu erzielen. Setzt man Aceton ein, dann verwendet man dieses in Mengen von etwa 0,5–10 Volumenteilen/Volumenteil an wäßrigem Kristallisationsmedium.

Die Stufe (c) führt man durch, indem man die Kristalle vom Kristallisationsmedium abtrennt, vorzugsweise mittels Vakuumfiltration. Anschließend wäscht man die Kristalle, beispielsweise mit Aceton/Wasser und dann mit Aceton alleine oder mit 0,1 N Schwefelsäure (z. B. 1/10 Volumen) und dann mit Aceton (z. B. 1/4 Volumen). Dann trocknet man, beispielsweise durch Trocknen im Vakuum bei 30–50°C während eines Zeitraums von 4–20 h.

Das hier beschriebene Verfahren zur Herstellung des Schwefelsäureadditionssalzes führt aufgrund der begrenzten Löslichkeit des Schwefelsäureadditionssalzes, verglichen mit der Zwitterionenform, zu einer Reinigung der Zwitterionenform. Dieses Verfahren kann somit dazu eingesetzt werden, das Zwitterion zu reinigen, ohne es als Feststoff zu isolieren. Soll aus dem gebildeten Schwefelsäureadditionssalz ein im wesentlichen reines Zwitterion (freie Base) gewonnen werden, dann kann man dies dadurch erreichen, daß man das Salz in Wasser löst, $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ in einer Menge von 90–100% der Theorie bei einem pH-Wert von weniger als 6,5 zur Ausfällung von BaSO_4 zugibt, das BaSO_4 abfiltriert und das Filtrat gewinnt, indem das Zwitterion gelöst ist, und es als Lösung verwendet oder das feste Zwitterion (freie Base) daraus durch Lyophilisieren isoliert. Es ist auch möglich, Aceton hinzuzugeben, um das amorphe Zwitterion auszufällen. Anschließend isoliert man das Zwitterion als Feststoff mittels Vakuumfiltration, wäscht z. B. mit Aceton und trocknet im Vakuum. In alternativer Weise kann man das Schwefelsäureadditionssalz in die freie Base überführen, indem man Ionenaustauschharze, beispielsweise Dowex WGR (ein schwach-basisches Anionenaustauschharz) und Dowex XU-40 090.01 (ein stark saures Kationenaustauschharz) einsetzt und anschließend lyophilisiert.

Das kristalline Di-Salpetersäureadditionssalz stellt man her, indem man

- (i) mindestens 2 Moläquivalente Salpetersäure mit
- (ii) dem Zwitterion

vermischt, das in der Mischung in einer Konzentration größer als 100 mg/ml vorliegt, und dann eine Kristallisation durch Animpfen oder Reiben mit einem Glasstab induziert, mit 2-Propanol verdünnt und kühlt. Das kristalline Disalpetersäureadditionssalz gewinnt man beispielsweise durch Filtrieren, Waschen nacheinander mit beispielsweise 2-Propanol- H_2O (50% V/V), 2-Propanol und Trocknen im Vakuum während eines Zeitraums von 2 h bei 50°C.

Das Mono-Chlorwasserstoffsäureadditionssalz stellt man her, indem man das Zwitterion in etwa 1 Moläquivalent Chlorwasserstoffsäure löst und kristallisiert, indem man Aceton unter Rühren zugibt unditerrührt. Die gebildeten Kristalle isoliert man anschließend, beispielsweise mittels Vakuumfiltration. Dann wäscht man mit Aceton und trocknet im Vakuum. In alternativer Weise kann man das Mono-Chlorwasserstoffsäureadditionssalz aus dem Di-Chlorwasserstoffsäureadditionssalz erhalten, indem man das Di-Chlorwasserstoffsäureadditionssalz in Methylenchlorid aufschlämmt und 1 Moläquivalent Triethylamin zugibt. Anschließend schlämmt man auf, wobei sich das Mono-Chlorwasserstoffsäureadditionssalz bildet, das man isoliert, beispielsweise durch Vakuumfiltration. Anschließend wäscht man mit Methylenchlorid und trocknet im Vakuum.

Das kristalline Di-Chlorwasserstoffsäureadditionssalz stellt man her, indem man das Zwitterion in mindestens 2 Moläquivalenten Chlorwasserstoffsäure löst, durch Zugabe von Aceton eine Kristallisation herbeiführt, die gebildeten Kristalle isoliert, beispielsweise durch Vakuumfiltration, mit Aceton wäscht und im Vakuum trocknet.

Das kristalline Di-orthophosphorsäure-Additionssalz stellt man her, indem man das Zwitterion in mindestens 2 Moläquivalenten Phosphorsäure löst, durch Zugabe von Aceton eine Kristallisation herbeiführt, die gebildeten Kristalle isoliert, beispielsweise mittels Vakuumfiltration, anschließend zuerst mit Aceton und dann mit Ether wäscht und dann im Vakuum trocknet. Das kristalline Sesqui-Orthophosphorsäure-Additionssalz erhält man nach dem gleichen Verfahren, wobei man jedoch 1,5 Moläquivalente Phosphorsäure einsetzt.

us den hier beschriebenen Salzen stellt man injizierbare Mittel her, die eine injizierbare Konzentration von 1 mg/ml bis zu 400 mg/ml an dem Zwitterion aufweisen, indem man mit sterilem Wasser verdünnt und puffert (pH-Wert: 3,5–7). Als geeignete Puffer kann man beispielsweise nennen: Trinatriumorthophosphat, Natriumbicarbonat, Natriumcitrat, N-Methylglucamin, L(+)-Lysin und L(+)-Arginin. Für eine intramuskuläre oder intravenöse Verabreichung an einen erwachsenen Patienten ist eine Gesamtdosierung von etwa 750 bis etwa 3 000 mg/Tag, aufgeteilt auf mehrere Dosen, normalerweise ausreichend.

Aus den hier beschriebenen Salzen injizierbare Mittel herzustellen, indem man lediglich steriles Wasser zugibt, ist nicht zweckmäßig, da die Schwefelsäure- und Di-Salpetersäureadditionssalze nicht ausreichend löslich sind, um Mittel mit einer für eine Verabreichung ausreichenden Konzentration zu ergeben, und da die hier beschriebenen Salze, wenn sie gelöst sind, zu Mitteln mit einem sehr niedrigen pH-Wert (1,8–2,5) führen, die nach Injektion eine Schmerzreaktion hervorrufen. Wie bereits oben ausgeführt, wurde es erfindungsgemäß gefunden, daß diese Nachteile dadurch überwunden werden können, daß man aus den hier beschriebenen Salzen ein physikalisches Gemisch (i. e. Mischung von Feststoffen) mit pharmazeutisch verträglichen, normalerweise festen nicht-toxischen organischen oder anorganischen Basen in solchen Anteilen herstellt, daß man nach Verdünnung des Gemisches mit Wasser bis zu einer injizierbaren Konzentration von 1 mg/ml bis zu 400 mg/ml an Zwitterion, z. B. einer Zwitterionenaktivität von 250 mg/ml (bestimmt mittels HPLC) einen pH-Wert von etwa 3,5 bis etwa 7, vorzugsweise von etwa 4 bis etwa 6 erzielt.

Die exakten Anteile der Bestandteile in dem physikalischen Gemisch variieren von Charge zu Charge des Salzes, da die Reinheit des Salzes von Charge zu Charge variiert. Die Anteile an Bestandteilen bestimmt man für eine bestimmte Charge, indem man vortitriert und mit einer Probe vergleicht, um einen gewünschten pH-Wert innerhalb des oben genannten Bereiches zu erhalten.

Das physikalische Gemisch kann man ohne Schwierigkeiten lagern und in fester Form vertreiben, wobei man die Vorteile der Stabilität der Salze ausnutzt. Das physikalische Gemisch kann zudem ohne Schwierigkeiten in ein injizierbares Mittel überführt werden, indem man lediglich Wasser zugibt. Dies kann von einer Kranken-

schwester oder einem Arzt kurz vor der Anwendung vorgenommen werden.

Das physikalische Gemisch stellt man her, indem man das Salz und die Base zu einer gleichmäßigen Mischung verarbeitet, beispielsweise unter Verwendung eines Standardmischers in einer trockenen Atmosphäre. Dann füllt man in Vials oder andere Behälter ab. Alle diese Handlungen müssen unter aseptischen Bedingungen vorgenommen werden.

Zu den Basen, die in dem Gemisch eingesetzt werden können, zählen beispielsweise Trinatriumorthophosphat, Natriumbicarbonat, Natriumcitrat, N-Methylglucamin, L(+)-Lysin und L(+)-Arginin. L(+)-Lysin und L(+)-Arginin sind bevorzugt, da die diese Verbindungen enthaltende Gemische zu injizierbaren Mitteln rekonstituiert werden können, die nach Injektion bei den Tieren eine geringere Schmerzreaktion hervorrufen als diejenigen Mittel, die sich von den Gemischen ableiten, welche die anderen Basen enthalten. Das L(+)-Lysin setzt man vorzugsweise in einem solchen Anteil ein, daß nach Verdünnen des Gemisches mit Wasser zu einem Mittel mit einer Zwitterionenaktivität von 250 mg/ml (bestimmt mittels HPLC) ein pH-Wert von 3,5–6 erreicht wird.

Die erfindungsgemäß erhältlichen Salze und die diese Salze enthaltenen trockenen physikalischen Gemische können ohne Kühlen und ohne Verwendung einer isolierenden Verpackung gelagert werden und behalten dennoch ihre hohe Wirksamkeit.

Bei verschiedenen der hier beschriebenen Präparate setzt man das instabile Zwitterion als Ausgangsverbindung ein. Die Herstellung dieses Zwitterions ist beschrieben in den Beispielen 1 bis 3 der US-PS 44 06 899 (Aburaki et al.). Das Zwitterion wird dort wie folgt bezeichnet: 7-[(Z)-2-Methoxyimino-2-(2-aminothiazol-4-yl)-acetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinium)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat.

Die Erfindung wird im folgenden anhand der Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Herstellung des Schwefelsäureadditionssalzes

1,5 g Zwitterion gibt man langsam zu 10 ml schnellgerührter 1N H₂SO₄ (1,59 Moläquivalente) bei 20–26°C. Man erhält eine Lösung. Man induziert eine Kristallisation, indem man mit kristallinem Schwefelsäureadditionssalz animpft und die kristalline Masse 0,5 h aufschlämmt. Die Kristalle trennt man dann durch Vakuumfiltration ab, wäscht sie mit 3 ml 50% Aceton/ Wasser (V/V) und mit zwei 5 ml-Portionen Aceton. Anschließend trocknet man im Vakuum bei 40–50°C über Nacht.

Die typische Ausbeute an Schwefelsäureadditionssalz beträgt 1,3 g.

Elementaranalyse für C₁₉H₂₄N₆O₅S₂·H₂SO₄:

	C	H	N	S	H ₂ O
ber.:	39,44	4,53	14,52	16,62	- %
gef.:	38,91	4,57	14,64	16,71	1,42%

Beispiel 2

Herstellung des Schwefelsäureadditionssalzes

1,5 g Zwitterion löst man in 5 ml Wasser. Man gibt 5 ml 1M H₂SO₄ langsam unter Rühren zu dieser Lösung. Man induziert die Kristallisation, indem man mit kristallinem Säureadditionssalz animpft und die kristalline Masse 0,5 h aufschlämmt. Man trennt die Kristalle durch Vakuumfiltration ab, wäscht sie mit 3 ml 50% Aceton/ Wasser (V/V) und zweimal mit 5 ml Aceton und trocknet im Vakuum über Nacht bei 40–50°C.

Das Schwefelsäureadditionssalz erhält man üblicherweise in einer Ausbeute von 1,3 g.

Beispiel 3

Herstellung des (HNO₃)₂-Säureadditionssalzes

300 mg des Zwitterions löst man in 2N Salpetersäure (0,5 ml). Die Lösung reibt man mit einem Glasstab, verdünnt mit 0,4 ml 2-Propanol und kühlt. Man sammelt die kristalline Titelverbindung und wäscht nacheinander mit 0,4 ml 2-Propanol/H₂O (1:1), 2-Propanol und dann mit Ether, wobei man 127 mg des Dinitratsalzes erhält.

Elementaranalyse für C₁₉H₂₄N₆O₅S₂·2HNO₃:

	C	H	N	S
Ber.:	37,62	4,32	18,47	10,57%
Gef.:	36,92	4,10	18,08	10,67

(H₂O-Gehalt 0,90%)

Beispiel 4

Herstellung des Monohydrochlorid-Säureadditionssalzes

1 g des Zwitterions löst man in 2,08 ml 1N HCl (1 Moläquivalent) bei 20–25°C. Man gibt unter heftigem Rühren während eines Zeitraums von 15 min 30 ml Aceton zu, wobei sich Kristalle bilden. Man rührt eine weitere Stunde. Man isoliert die Kristalle durch Vakuumfiltration, wäscht mit 10 ml Aceton und trocknet im Vakuum 2 h bei 50°C.

Eine typische Ausbeute an dem kristallinen Monohydrochloridsalz beträgt 0,9 g.

Elementaranalyse für $C_{19}H_{24}N_6O_5S_2 \cdot HCl$:

	C	H	N	S	Cl	H ₂ O
Ber.:	41,37	4,75	15,2	11,63	12,86	- %
Gef.:	39,32	4,88	13,95	11,28	12,44	4,5%
(Korrigiert für H ₂ O:	41,17		14,61	11,82	13,03 %)	

Beispiel 5

Herstellung des Dihydrochlorid-Säureadditionssalzes und Herstellung des Monohydrochlorid-Säureadditionssalzes aus ersterem Salz

Man löst 350 mg Zwitterion in 2 ml 1N HCl. Man gibt unter heftigem Rühren während eines Zeitraums von 5 min 10 ml Aceton zu der erhaltenen Lösung, wobei sich Kristalle bilden. Man rührt weitere 5 min, gibt dann weitere 10 ml Aceton zu und rührt weitere 0,5 h. Man entfernt die Kristalle durch Vakuumfiltration, wäscht zweimal mit 5 ml Aceton und trocknet 24 h im Vakuum bei 40–45°C.

Eine typische Ausbeute an kristallinem Diphydrochlorid-Säureadditionssalz beträgt 300 mg.

Elementaranalyse für $C_{19}H_{24}N_6O_5S_2 \cdot 2HCl$:

	C	H	N	S	Cl	H ₂ O
Ber.:	41,38	4,75	15,2	11,62	12,8	- %
Gef.:	40,78	4,98	14,7	11,25		1,25%
(Korrigiert für H ₂ O:	41,1		14,88	11,39	11,94 %)	

Man schlämmt 1 g des so hergestellten Diphydrochloridsalzes in 20 ml Methylenchlorid von 20–25°C in einem verschlossenen Kolben auf und gibt während eines Zeitraums von 15 min 0,28 ml Triethylamin zu. Man schlämmt die kristalline Masse dann 5 h auf. Man isoliert die erhaltenen Monohydrochloridkristalle dann durch Vakuumfiltration, wäscht sie zweimal mit 5 ml Methylenchlorid und trocknet 2 h im Vakuum bei 50°C. Eine typische Ausbeute beträgt 800 mg.

Beispiel 4

Herstellung des Di-Orthophosphorsäure-Additionssalzes

1 g Zwitterion löst man in 3,4 ml von 144 mg/ml H_3PO_4 (2,2 Moläquivalente) bei 15°C. Man filtriert die Lösung in geeigneter Weise, um sie zu klären. Unter heftigem Rühren und während eines Zeitraums von 10 min gibt man 12 ml Aceton zu der geklärten Lösung, wobei sich Kristalle bilden. Man rührt weitere 10 min, gibt dann 30 ml Aceton während eines Zeitraums von 10 min zu und rührt weitere 15 min. Man sammelt die Kristalle mittels Vakuumfiltration, wäscht sie zweimal mit 5 ml Aceton und zweimal mit 5 ml Ether und trocknet 16 h im Hochvakuum.

Eine typische Ausbeute an kristallinem Diorthophosphorsäure-Additionssalz bei dieser Art der Herstellung beträgt 1,1 g.

Elementaranalyse für $C_{19}H_{24}N_6O_5S_2 \cdot 2H_3PO_4$:

	C	H	N	H ₂ O
Ber.:	33,72	4,47	12,42	- %
Gef.:	33,43	4,65	12,02	1,82%
(Korrigiert für H ₂ O:	34,0		12,2 %)	

Das Sesqui-orthophosphorsäure-Additionssalz erhält man wie oben beschrieben, wobei man jedoch 1,5 Moläquivalente H_3PO_4 statt der 2,2 Moläquivalente einsetzt.

Beispiel 7

Stabilitätsuntersuchungen bei erhöhten Temperaturen

Die Stabilitätsuntersuchungen bei erhöhter Temperatur wurden durchgeführt, indem die Präparate in Trockenbehältern bei den nachstehend aufgeführten Temperaturen für die ebenfalls nachstehend aufgeführten Zeiträume gelagert wurden. Die Wirksamkeitszunahmen bzw. -verluste wurden mittels HPLC bestimmt. Eine Wirksamkeitszunahme wird durch ein Pluszeichen vor der Zahl angezeigt. Ein Wirksamkeitsverlust von weniger als 10% während eines Zeitraums von 2–4 Wochen bei 45–56°C zeigt normalerweise an, daß der Wirksamkeitsverlust bei einer 2- bis 3-jährigen Lagerung bei Raumtemperatur weniger als 10% beträgt.

Prozentualer Verlust

Substanz	45°C (Wochen)		4	6	56°C (Wochen)		4	100°C (Tage)
	1	2			1	2		1
Zwitterion	37	51	71	-	57	-	-	100
H ₂ SO ₄ -Salz	2,4 - +5	3	+5	1,4	5 - +6	+3	0 - +6	0 - 10
(HNO ₃) ₂ -Salz	8,8	3,4	0,68	10,3	3,7	2,4	-	-
HCl-Salz	4,8	2,3	6,0	6,4	6,4	-	-	-
(HCl) ₂ -Salz	0	-	7,4	-	0	-	7,2	12,4
(H ₃ PO ₄) ₂ -Salz	0	3,0	1,0	-	2,7	5,0	-	-

Beispiel 8

Untersuchungen der physikalischen Gemische

Es wurden physikalische Gemische des kristallinen Schwefelsäuresalzes mit

(a) Trinatriumorthophosphat,

(b) Natriumbicarbonat,

(c) L(+)-Lysin und

(d) L(+)-Arginin

hergestellt. Die Basen wurden in solchen Mengen zugegeben, daß nach Verdünnen des Gemisches mit Wasser bis zu einer Zwitterionenaktivität von 250 mg/ml (bestimmt mittels HPLC-Assay) die folgenden pH-Werte erhalten wurden:

Trinatriumorthophosphat (pH-Wert von 6,0),

Natriumbicarbonat (pH-Wert von 6,0);

L(+)-Lysin (pH-Wert von 6,0);

(+) Arginin (pH-Wert von 6,0).

Durch Rekonstitution mit sterilem Wasser bis zu einer Zwitterionenaktivität von 250 mg/ml (bestimmt mittels HPLC-Assay) wurden injizierbare Mittel hergestellt. Dabei treten keine Löslichkeitsprobleme auf. Kaninchen wurden Injektionen (100 mg/kg) intramuskulär verabreicht, wobei sich die Schmerzreaktionen in Grenzen hielten. Die geringste Schmerzreaktion trat bei dem Arginin enthaltenden Mittel auf.

Setzt man die anderen hier beschriebenen Salze in den physikalischen Gemischen mit den oben beschriebenen Basen ein, dann erhält man ähnliche Ergebnisse. Die Löslichkeit ist ähnlich gut und der nach der intramuskulären Injektion auftretende Schmerz liegt im ertragbaren Rahmen.

Die Fig. 1 zeigt das Infrarot-Absorptionsspektrum des kristallinen 7-[α -(2-Aminothiazol-4-yl)- α -(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat-Sulfatsalzes (hergestellt gemäß den Beispielen 1 oder 2). Das Spektrum wurde mit einem KBr-Preßling aufgenommen.

Die Fig. 2 zeigt das Infrarot-Absorptionsspektrum des kristallinen Sesquiphosphatsalzes von 7-[α -(2-Aminothiazol-4-yl)-3-(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat (KBr-Preßling).

Die Fig. 3 zeigt das Infrarot-Absorptionsspektrum des kristallinen Diphosphatsalzes von 7-[α -(2-Aminothiazol-4-yl)-3-(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat (KBr-Preßling).

Das Röntgenbeugungs-Pulverdiagramm des kristallinen Sulfatsalzes von 7-[α -(2-Aminothiazol-4-yl)- α -(Z)-methoxyiminoacetamido]-3-[(1-methyl-1-pyrrolidinio)-methyl]-3-cephem-4-carboxylat (hergestellt gemäß den Beispielen 1 oder 2) wurde mit einem Rigaku-Pulverdiffraktometer unter Verwendung einer Kupfer-Röntgenröhre und eines Nickelfilters aufgenommen, wobei sich die Probe in einer Glasschale befand. Die Scangeschwindigkeit betrug 2°/min über einen Bereich von 5–40°. Zur Bestimmung der Winkel der maximalen Beugung wurde ein Diagramm mechanisch aufgezeichnet. Daraus wurden die Abstände (d) und die relativen Intensitäten (I/I_0) berechnet. Diese Daten sind nachstehend aufgelistet.

d Abstand (Å)	I/I_0 %
9,20	100
6,80	50
5,50	28
5,09	22
4,50	38
4,41	44
4,19	63
3,78	38
3,64	44
3,39	25
3,31	31
3,15	47

Beispiel 9

Herstellung des Sesquiphosphatsalzes

Man löst 0,70 g Zwitterion unter heftigem Rühren in 2,2–2,4 ml 85%iger Phosphorsäure (2,8–2,2 Moläquivalente), die 1:1 (V/V) mit Wasser verdünnt ist. Zum Klären der Lösung filtriert man sie durch ein Membranfilter mit einer Porengröße von 0,22–0,45 µm. Zum Filtrat gibt man unter heftigem Rühren während eines Zeitraums von 30–60 min 5–7 Vol.-Teile (15–20 ml) Methanol. Dabei bilden sich Kristalle. Man rührt weitere 1,5–2 h heftig. Man gewinnt das kristalline Produkt mittels Vakuumfiltration, wäscht es auf dem Filter zuerst mit 6–8 ml Methanol/Aceton (1:1 V/V), wobei man darauf achtet, daß der Filterkuchen eng zusammenbleibt, und dann mit Aceton und trocknet das Produkt 2 h bei 50° C im Vakuum; typische Ausbeute: 0,7–0,75 g.

Interpretation des Infrarot-Spektrums (vgl. Fig. 2) (IR, KBr-Preßling)

Lage des Peaks (cm ⁻¹)	Funktionelle Gruppe
2800–3400	NH, NH ₃ ⁺ , Carboxyl OH
1780	β-Lactam C=O
1680	Carboxyl C=O
1660	Amid C=O
1630	C=N, C=C
1550	Amid OH
980, 1040	PO ₄ ⁼

Verhalten beim Erhitzen:

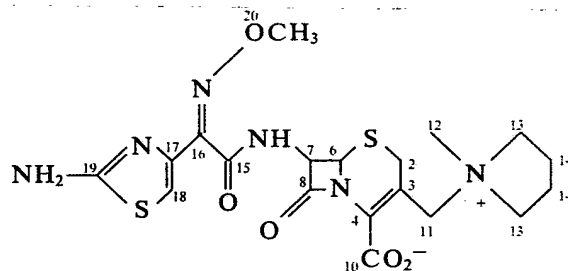
Beim Untersuchen im Differential-Kalorimeter findet man bei 171,8° C ein Exotherm.

Röntgenbeugungsdiagramm:

Das Röntgenbeugungs-Pulverdiagramm des zuvor beschriebenen Sesquiphosphatsalzes wurde auf die gleiche Weise mit einem Rigaku-Pulverdiffraktometer bestimmt, wie das vorstehend beim Sulfatsalz beschrieben ist. Das Ergebnis ist nachstehend wiedergegeben:

d	I/I ₀
11,04	- 32
9,2	- 16
7,89	- 24
7,02	- 42
6,7	- 32
5,5	- 26
4,64	- 100
4,456	- 53
4,3	- 58
3,88	- 26
3,75	- 89
3,56	- 21
3,31	- 26
3,05	- 16

Interpretation des H-NMR-Spektrums (90 MHz, D₂O-Lösung) von:



Chemische Verschiebung (ppm in δ gegenüber TSP)	Beschreibung	Integral	Zuordnung
2,0–2,4	Multiplett	4	14 CH ₂ , 14' CH ₂
3,04	Singulett	3	12 CH ₃
3,3–3,6	Multiplett	5	2 CH, 13 CH ₂ , 13' CH ₂
3,94	Dublett	1	2 CH
4,12	Singulett	3	20 CH ₃
4,12	Dublett	1	11 CH

(Fortsetzung)

Chemische Verschiebung (ppm in δ gegenüber TSP)	Beschreibung	Integral	Zuordnung
4,8	Dublett	1	11 CH
5,42	Dublett	1	6 CH
5,88	Dublett	1	7 CH
7,21	Singulett	1	18 CH

Stabilität:

Zeit	Temperatur	prozentualer Verlust
1 Tag	100 °C	10,9
3 Tage	70 °C	0
7 Tage	70 °C	1,9
1 Woche	56 °C	1,0
2 Wochen	56 °C	1,4
4 Wochen	56 °C	0
1 Woche	45 °C	0
2 Wochen	45 °C	1,4
4 Wochen	45 °C	0,7
8 Wochen	45 °C	1,6
1 Monat	37 °C	2,5

Elementaranalyse (Gew.-%):

	Gefunden	Auf Trockenbasis	Theorie (Sesquiphosphat)
C	35,44	36,3	36,4
H	4,66	4,41	4,7
N	12,88	13,2	13,4
H ₂ O	2,29*	–	Monohydrat = 2,8% H ₂ O
H ₃ PO ₄	23,06	23,6	23,6

*bestimmt nach Karl Fischer

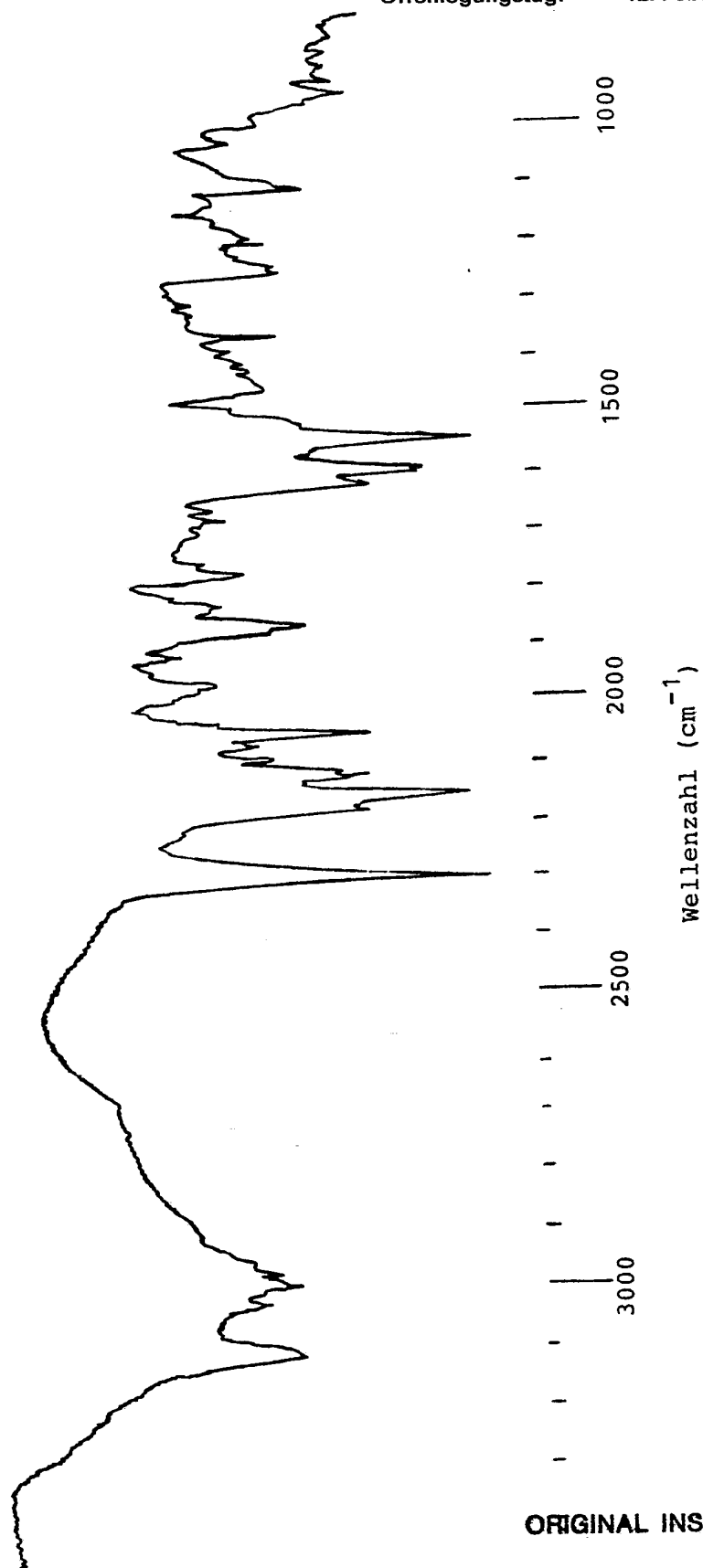
- Leerseite -

3626375

Nummer:
Int. Cl.⁴:
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

36 26 375
C 07 D 501/56
4. August 1986
12. Februar 1987

Figur 1

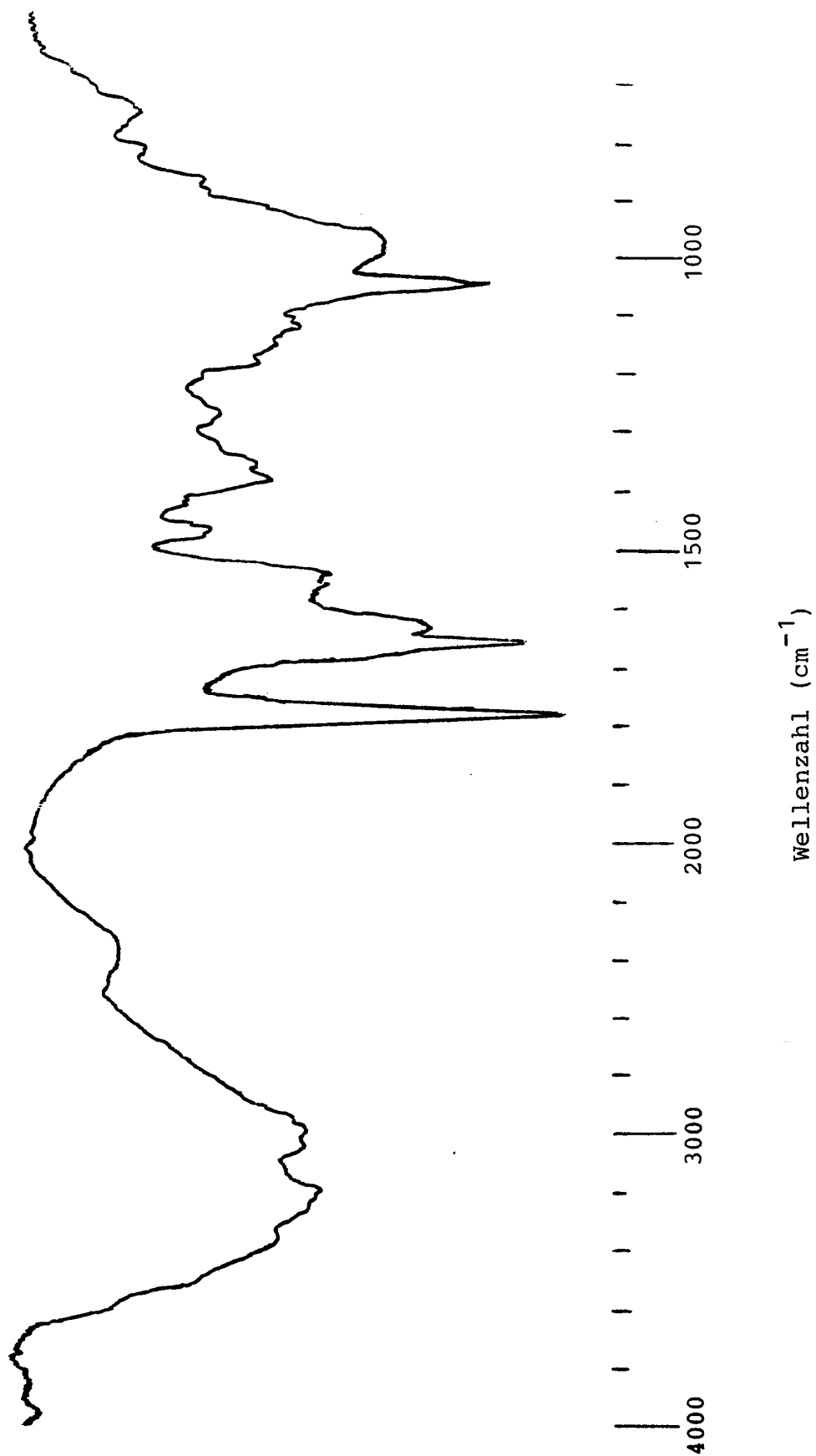


ORIGINAL INSPECTED

Durchlässigkeit %

3626375

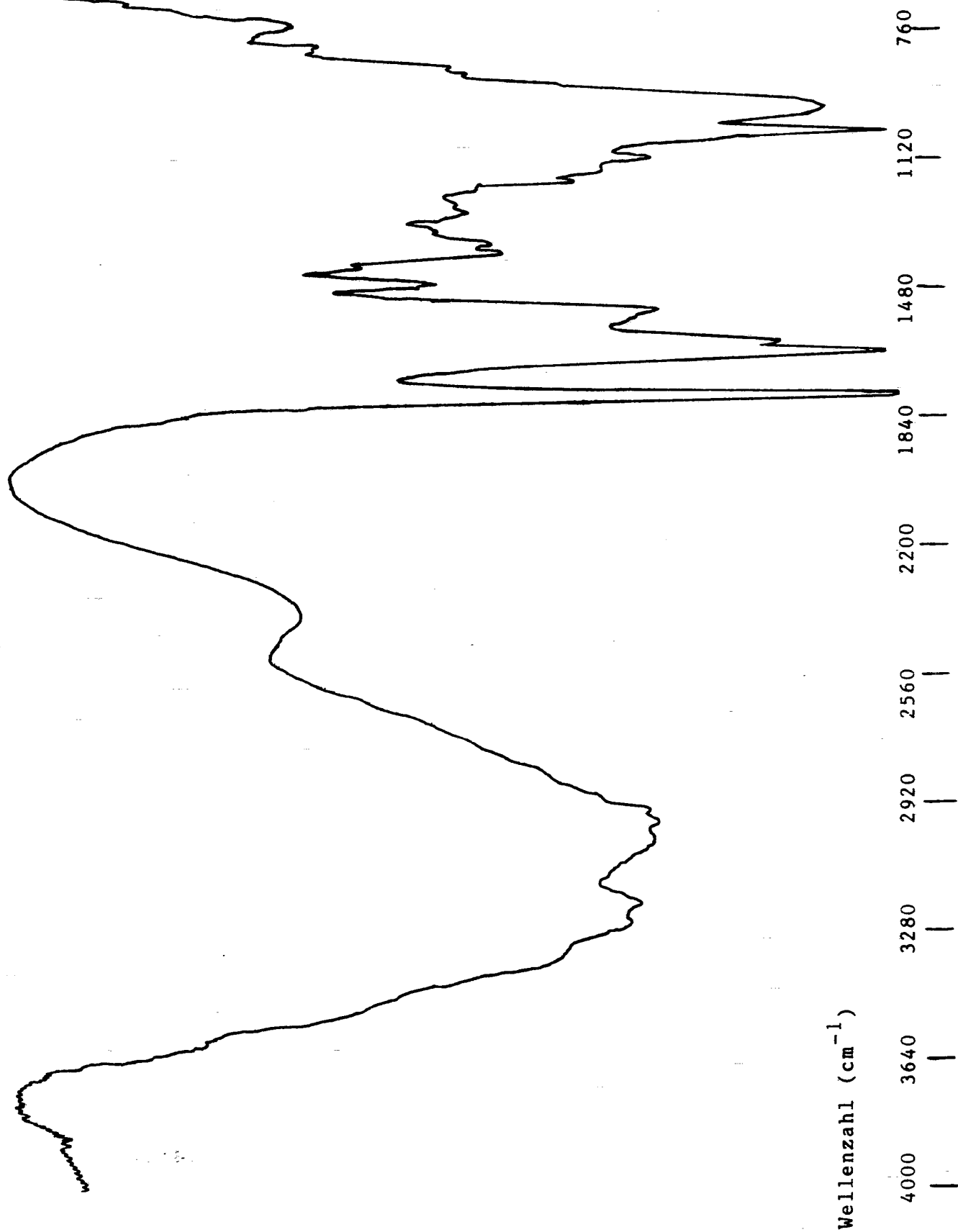
Figur 2



ORIGINAL INSPECTED

Durchlässigkeit %

Figur 3



ORIGINAL INSPECTED

Durchlässigkeit %